

CRISPR/Cas9 基因编辑技术及其在动物细胞系构建中的应用

葛玉凤, 安芳兰, 刘学荣, 崔治亮, 田波* (中农威特生物科技股份有限公司, 甘肃兰州 730046)

摘要 CRISPR/Cas9[Clustered regular interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR-associated protein 9]系统是广泛存在于细菌和古生菌中可降解入侵病毒和噬菌体 DNA 的一种基因定点编辑技术, 由于其具有快速、精准、高效, 易于设计, 且特异性高等优势, 得到了广泛的应用。概述了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展历程, 并介绍其结构和编辑原理、在动物细胞系构建中的应用及展望, 以便为更合理地应用和改进该技术提供系统的文献参考。

关键词 CRISPR/Cas9 基因编辑技术; 动物细胞系; 构建

中图分类号 Q 789 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)35-0009-02

Application of CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Construction of Animal Cell Lines

GE Yu-feng, AN Fang-lan, LIU Xue-rong et al (Chain Agricultural Vet. Bio. Science and Technology Co., Ltd., Lanzhou, Gansu 730046)

Abstract CRISPR/Cas9[Clustered regular interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR-associated protein 9]system is a gene fixed-point editing technology widely found in bacteria and archaea that degrades invasive virus and bacteriophage DNA. It has been widely used because of its rapid, accurate, efficient, easy to design, and high specificity. The development of CRISPR/Cas9 gene editing technology was reviewed, its structure and editing principle, its application and prospect in animal cell system construction were introduced in order to provide systematic reference for more rational application and improvement of the technology.

Key words CRISPR/Cas9; Animal cell lines; Construction

1 CRISPR/Cas9 的基因座结构和编辑原理

20 世纪 80 年代, 日本学者 Nakata 在大肠杆菌基因组中发现了一系列的短的间隔序列^[1], 但其功能一直未研究清楚。随着基因测序技术的发展, 人们发现这些重复序列广泛存在于细菌和古细菌基因组中, 2002 年将其正式命名为 CRISPR。直到 2008 年, CRISPR/Cas9 才被证明具有免疫能力, 在 *E. coli* 中成熟的 crRNAs 引导形成 Cas 蛋白复合体, 从而抑制病毒的增殖^[2]。2012 年, 由 RNA 介导的基因组编辑技术 CRISPR/Cas9 正式建立, 并完成了在哺乳动物细胞中的基因组编辑^[3-5]。

基因编辑技术是通过基因的定点突变, 以小片段的删除及目的基因的插入等方式对基因组进行精确修饰的一种技术, 是研究基因功能的重要手段。基因编辑技术经历了一个长期而艰巨的研发历程, 锌指核酸酶(ZFNs)是第一代人工核酸内切酶, 较传统的基因敲除技术易于操作, 效率高, 周期短, 曾被应用于动物和细胞的定点修饰和基因敲除, 但随着基因研究技术的发展, ZFNs 技术在实际应用中存在制备繁琐, 效能低, 成本高的缺点, 因此, TALEN 技术应运而生。2011 年, TALEN 技术成功应用于目的基因的编辑^[6-8], 该技术应用简单高效, 细胞毒性较小, 被广泛应用于动植物细胞、人细胞及斑马鱼等模式生物的研究中, 但该技术的靶点模块建立较复杂, 耗时较长。截至 2013 年, Cong 和 Mali 将 CRISPR/Cas9 系统成功应用于人类和小鼠基因组编辑, 第三代人工核酸内切酶技术- CRISPR/Cas9 技术诞生, 并迅速成为各国学者研究的重点基因编辑技术, 广泛应用于各种模式动物模型和细胞系的建立。

CRISPR/Cas9 是存在于大多数细菌和古生菌中的一种获得性免疫系统。由多个重复序列和非重复的间隔序列组成, 主要包括 R-S 结构和编码 cas 的基因操作子。R-S 结构具有特异性识别外源 DNA 的功能, cas 基因家族可编码多功能的 CRISPR 蛋白, 并与成熟的 crRNA 共同作用^[9] 构建抵御外来病毒入侵的免疫屏障。根据 CRISPR/Cas9 系统中 cas 蛋白的不同, 将 CRISPR/Cas9 系统分为 I、II 和 III 3 种类型。I 型和 III 型 CRISPR/Cas9 系统需要多个 Cas 蛋白的参与, II 型 CRISPR/Cas9 系统仅需要 Cas9 蛋白即可对 DNA 特定位点进行修饰, 是目前研究的最彻底, 也是应用最为广泛的。其作用机制主要通过三个阶段实现: 获得 CRISPR 可变间隔序列、转录 crRNA 前体与加工 crDNA、crRNA-tracrRNA-Cas9 复合体剪辑外源性 DNA^[10]。与传统的 ZFN、TALEN 基因编辑技术相比, CRISPR/Cas9 系统通过设计不同的 RNA 向导对基因进行定点修饰, 操作简单易行, 高效, 基因修饰可遗传, 无物种限制, 实验周期较短, 成本较低, 对细胞毒性较小, 适合于多基因、高通量的操作, 可应用在各种不同的细胞和模式生物中, 且发生同源重组的概率比自然发生同源重组的概率高。

2 CRISPR/Cas9 技术在动物细胞系构建中的应用

随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的研究深入和不断完善, 该技术已成为动植物基因功能研究、建立细胞系和疾病模型的主要手段, 尤其在动物细胞系的建立方面起到了重要的作用, 目前, 该技术在动物细胞系建立中的应用主要包括基因敲除、基因插入和基因修饰 3 个方面。

2.1 基因敲除 我国科学家针对猪的酪氨酸酶、PARK2 和 PINK1 基因的外显子设计了 Cas9 打靶质粒, 获得了纯合的酪氨酸酶基因敲除以及 PARK2 和 PINK1 双基因敲除的细胞系, 该细胞系用于体细胞核移植后, 成功培育出酪氨酸酶基因敲除猪和 PARK2 和 PINK1 双基因敲除猪, 建立了人类白

基金项目 甘肃省自然科学基金项目(17JR5RA022)。
作者简介 葛玉凤(1984—), 女, 甘肃靖远人, 工程师, 硕士, 从事动物细胞无血清培养基的研发。* 通讯作者, 助理研究员, 博士, 主要从事动物疫苗的研发工作。
收稿日期 2018-08-23; **修回日期** 2018-09-03

化病和帕金森综合征 2 种猪模型,该研究团队首次将 CRISPR/Cas9 技术与体细胞克隆相结合,实现了大型家禽双基因的等位敲除,这对于人类遗传性疾病的研究有重大意义^[11]。近期,又有中国学者通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了酪氨酸酶(TYR)等位基因突变的猪胎儿成纤维细胞系和 PARK2 和 PINK1 双基因 knock-out 的细胞系,成功培养出基因突变的个体,并可稳定遗传给下一代。韩秋影等^[12]利用 CRISPR/Cas9 技术实现了细胞水平的基因敲除技术,同时构建了能稳定表达 Cas9 蛋白的 HEK293 细胞,并运用 CRISPR/Cas9 基因转录激活技术,使得 HEK293 细胞 cGAS 基因的转录激活。MEIS2(一种高度保守的同源盒转录因子)可广泛调控胚胎的早期发育和肿瘤的发生,研究者^[13]通过设计 2 个靶向 sgRNA,介导外源 Cas9 蛋白与基因特异性位点结合,构建了可稳定敲除 MEIS2 基因的 HEK293T 细胞株。

2.2 基因敲入 传统的基因定点敲入是通过同源重组的方式将目的基因整合到细胞基因组中,筛选产量较高的单克隆,但此方法无法精确控制基因的插入位点,因此整合效率较低。CRISPR/Cas9 技术为构建稳定高产的重组细胞提供了可行性。有研究发现 CTCF(脊椎动物关键的绝缘子蛋白)对动物细胞基因表达调控起着重要的作用,其缺失会导致小鼠胚胎死亡。通过 CRISPR/Cas9 技术介导的同源重组技术,将 MD(有丝分裂期特异性降解结构域)敲入 CTCF 表达框上游,从而带动 CTCF 蛋白周期性持续降解,获得了 CTCF 蛋白特异性降解细胞系^[14],体现了 CRISPR/Cas9 技术对基因组改造的简易性和特异性。段宇红^[15]等将 4 种不同的表达 PCV2(猪圆环病毒)功能蛋白基因定点插入到 PK15 细胞的 Rosa26 位点,从而建立了稳定的可表达 PCV2 的细胞系,为研究 PCV2 病毒在哺乳动物细胞中复制水平低的机制奠定了基础。

2.3 基因修饰 WHO 统计结果显示,目前世界上有近 6 000 多种疾病与基因发生异常相关,但在临床上仍缺乏有效的治疗体系,由于干细胞具有较强的可塑性和重建能力,因此干细胞基因修饰技术成为构建疾病模型、筛选靶向药物和制备治疗型干细胞的关键技术,也成为了人类基因疾病治疗的新希望。王晔博^[16]等利用 CRISPR/Cas9 系统编辑原理,在人的多功能干细胞 WAN 基因第 6 个内含子的高突变位点区域,设计了 2 个 gRNAs,通过 IDLV 携带模板序列的方法筛选出了同源重组子,其正确率达 50%,有效优化了人多功能干细胞中基因编辑效率,为研究发育生物学和某些疾病的机理提供了操作平台。有学者^[17]利用 Cas9 核酸酶在 sgRNA 介导下可引起基因组 DNA 双链断裂,从而形成同源重组修复的特性,构建了绿色荧光标记的 CD34 报告基因 293AD 细胞系,为后续人体细胞诱导去分化成造血干细胞提供了有利的工具。韩笑等^[18]利用 gRNA 定位,引导 Cas9 蛋白精确定位进行 DNA 剪切,并启动 DNA 自我修复机制,建立了能稳定表达 Cas9 蛋白的小鼠胚胎干细胞系,实现了多个位点的同时编辑,同时运用 Cas9 核酸酶在 DNA 双链上精

确剪切 DNA,降低了 Cas9 剪切 DNA 的脱靶率,有效提高了应用 CRISPR/Cas9 技术在胚胎干细胞中进行基因编辑的效率。

因此,高效的基因编辑技术和精确的基因操作方法为构建所需的细胞系提供了必要的手段。目前,CRISPR/Cas9 技术作为近几年兴起的第三代基因编辑技术,日渐广泛应用于病毒基因组的编辑、细胞系的建立及人类疾病模型的研究等各领域,提供了一种简单高效的基因重组的筛选方法,极大地推动了基因工程技术的应用研究。

3 展望

CRISPR/Cas9 技术已开发为具有多功能的技术,但在长期的研究应用中发现,CRISPR/Cas9 技术在动植物细胞基因改造及其他应用方面存在着脱靶的风险。而且在基因编辑过程中,CRISPR/Cas9 产生 DNA 双链断裂的同时可能激活 p53 蛋白通路,从而导致基因编辑失败,在临床治疗中产生风险。因此,结合以上对 CRISPR/Cas9 系统结构和编辑原理、在动物细胞系建立中的应用及存在的问题等现状的分析,可进一步完善 CRISPR/Cas9 系统在干细胞中的同源修饰效率、在干细胞中对遗传性 P-globing 异常疾病的基因治疗及 p53 基因功能监控等方面的研究,最终为生物医学领域的疾病研发、精准医疗和个体化医疗提供服务。

参考文献

- [1] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5249-5433.
- [2] MAKAROVA K S, GRISHIN N V, SHABALINA S A, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J]. Biol Direct, 2006, 1:7.
- [3] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas9 systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [4] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [5] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. Nature biotechnology, 2014, 32(4): 347-355.
- [6] LI T, HUANG S, JIANG W Z, et al. TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(1): 359-372.
- [7] MILLER J C, TAN S Y, QIAO G J, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143-148.
- [8] MAHFOUZ M M, LI L X, SHAMIMUZZAMAN M, et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(6): 2623-2628.
- [9] BHAYA D, DAVISON M, BARRANGOU R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. Annu Rev Genet, 2011, 45: 273-297.
- [10] GARNEAU J E, DUPUIS M, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468: 67-71.
- [11] 科学家新建立两种基因敲除克隆猪模型[J]. 中国畜禽种业, 2014(12): 149.
- [12] 韩秋影, 蔡宏薛文, 等. CRISPR/Cas9 基因转录激活技术的建立及其应用[J]. 科学技术与工程, 2016, 16(20): 22-25, 36.
- [13] 卢利莎, 白杨, 刘鑫, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建敲除 MEIS2 基因的 HEK293T 人胚肾细胞系[J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(4): 535-541.

双单倍体材料(DH)的创制就显得尤为重要。

参考文献

- [1] 倪丕冲. 我国水稻花药育种及其应用[J]. 农业科技通讯, 1991(5): 5-6.
- [2] 海燕, 康明辉. 高产早熟小麦新品种花培3号的选育[J]. 河南农业科学, 2007(5): 36-37.
- [3] 康明辉, 海燕, 赵永英, 等. 高产广适小麦新品种花培8号的选育及特征特性[J]. 种业导刊, 2010(6): 21-23.
- [4] 李欣, 潘学彪, 陈宗祥, 等. 光敏雄性不育水稻的花药培养及密矮64s的选育[J]. 江苏农学院学报, 1995, 16(4): 7-12.
- [5] 黄翠红, 黄明, 陈淳, 等. 水稻光温敏核不育系Y58S花培后代改良株系的分子鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2018, 47(3): 274-280.
- [6] 戴林建, 陈武, 周田, 等. 利用花药培养选育烤烟抗黑胫病突变体[J]. 作物杂志, 2018(1): 66-70, 175.
- [7] 李怡斐, 张世才, 蒋晓英, 等. 利用花药培养技术创制加工型辣椒细胞质雄性不育恢复系[J]. 分子植物育种, 2017, 15(6): 2317-2321.
- [8] 邢永萍, 张树根, 李春林, 等. 甜椒新品种海丰16号的选育[J]. 中国蔬菜, 2014(6): 49-51.
- [9] 孙敬三, 路铁刚, SINDAHL M R. 燕麦花药培养和单倍性悬浮细胞培养物的建立[J]. 植物学报, 1991(6): 417-420, 490.
- [10] 梁守义, 黄守印. 未授粉的燕麦幼嫩子房培养中再生植株的诱导[J]. 植物生理学通讯, 1984(5): 41-42.
- [11] 王子霞, 戚家华, 海热古力·阿布力孜, 等. 燕麦颖片培养及再生植株后代性状[J]. 新疆农业科学, 1994(1): 26-27.
- [12] 郝林, 奚扬, 李献阳, 等. 裸燕麦幼叶叶片离体培养中体细胞胚状体发生[J]. 西北植物学报, 1991, 11(4): 271-275.
- [13] ZHANG S, ZHANG H, ZHANG M B. Production of multiple shoots from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) [J]. Journal of plant physiology, 1996, 148(6): 667-671.
- [14] TORBERT K A, RINES H W, SOMERS D A. Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures [J]. Crop science, 1998, 38(1): 226-231.
- [15] 范银燕, 崔林. 裸燕麦幼穗愈伤组织诱导及植株再生技术[J]. 山西农业科学, 1996(1): 14-17.
- [16] RINES H W. Oat anther culture: Genotype effects on callus initiation and the production of a haploid plant [J]. Crop science, 1983, 23(2): 268-272.
- [17] 杨才, 赵云云, 孙敬三, 等. 用未成熟胚离体培养法获得四倍体大燕麦与六倍体裸燕麦杂种植株的研究初报[J]. 麦类作物学报, 1998, 18(5): 36-37.
- [18] 贾利敏. 燕麦成熟胚组织培养及植株再生体系建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [19] 罗志娜. 燕麦成熟胚组织培养及再生体系建立[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [20] 王迅婧, 汉丽萍, 赵骥民. 燕麦遗传转化的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(7): 3930-3932.
- [21] 宋秀芳, 倪汉文. 燕麦愈伤组织的诱导[J]. 作物杂志, 2010(3): 56-59.
- [22] CHUNG S W. Anther culture in oats (*Avena sativa* L.) [D]. Montreal: McGill University, 1980.
- [23] RINES H W. Oat anther culture: Genotype effects on callus initiation and the production of a haploid plant [J]. Crop Sci, 1983, 23: 268-272.
- [24] POLSONI L. The induction of microspore embryogenesis in anther culture of oats (*Avena sativa* L.) [D]. Guelph: University of Guelph, 1991.
- [25] SUN C S, LU T G, SONDAHL M R. Anther culture of naked oat and the establishment of its haploid suspension cell [J]. Acta Bot Sin, 1991, 33: 417-420.
- [26] KIVIHARJU E, PUOLIMATKA M, SAASTAMOINEN M, et al. The effect of genotype on anther culture response of cultivated and wild oats [J]. Agricultural and food science in Finland, 1998, 7(3): 409-422.
- [27] 杨才, 王秀英. 采用花药单倍体育种方法育成花中21号燕麦新品种[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2005, 21(3): 39-42.
- [28] KIVIHARJU E, PUOLIMATKA M, PEHU E. Regeneration of anther-derived plants of *Avena sterilis* [J]. Plant cell tissue & organ culture, 1997, 48(2): 147-152.
- [29] NOGA A, SKRZYPEK E, WARCHOL M, et al. Conversion of oat (*Avena sativa* L.) haploid embryos into plants in relation to embryo developmental stage and regeneration media [J]. In vitro cellular & developmental biology-plant, 2016, 52(6): 590-597.
- [30] PALMER C E, KELLER W A. Pollen embryos [M]//SHIVANNA K R, SAWHNEY V K. Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997: 392-422.
- [31] RASHID A. Induction of haploid plant/cell. Cell physiology and genetics of higher plants: Vol. 1 [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988: 119-158.
- [32] FEROUGH-WEHR B, WENZEL G. Andro- and parthenogenesis [M]//HAYWARD M D, BOSEMARK N O, ROMAGOSA I. Plant breeding - Principles and prospects. London: Chapman & Hall, 1993: 261-279.
- [33] FERRIE A M R, IRMEN K I, BEATTIE A D, et al. Isolated microspore culture of oat (*Avena sativa* L.) for the production of doubled haploids: Effect of pre-culture and post-culture conditions [J]. Plant cell tissue & organ culture, 2014, 116(1): 89-96.
- [34] KIVIHARJU E, MOISANDER S, LAURILA J. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2005, 81(1): 1-9.
- [35] SUNDERLAND N, HUANG B. Ultrastructural aspects of pollen dimorphism [J]. Int Rev Cytol, 1987, 107: 175-220.
- [36] RAGHAVAN V. Pollen developmental biology in cultured anthers [M]//VASIL I K. Cell culture and somatic cell genetics of plants: Vol. 3. San Diego: Academic Press, 1986: 275-304.
- [37] SIDHU P K, DAVIES P A. Regeneration of fertile green plants from oat isolated microspore culture [J]. Plant cell reports, 2009, 28(4): 571-577.
- [38] KIVIHARJU E, PUOLIMATKA M, SAASTAMOINEN M, et al. The effect of genotype on anther culture response of cultivated and wild oats [J]. Agricultural & food science in Finland, 1998, 7(3): 409-422.
- [39] KIVIHARJU E, PUOLIMATKA M, SAASTAMOINEN M, et al. Extension of anther culture to several genotypes of cultivated oats [J]. Plant cell reports, 2000, 19(7): 674-679.
- [40] KELLEY R Y, ZIPF A E, WESENBERG D E, et al. Comparative evaluation of three tissue culture methods for the improvement of plant regeneration from diverse Oat (*Avena ssp* L.) genotypes [J]. Cereal research communications, 2004, 32(1): 113-118.
- [41] SMITH D L, KRICKORIAN A D. Somatic embryogenesis of carrot in hormone free medium: External pH control over morphogenesis [J]. Am J Bot, 1990, 77(12): 1634-1647.
- [17] 吴福仁, 康雪晴, 庄园, 等. CRISPR/Cas9 介导的 CD34 报告基因 293AD 细胞系的构建 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 472-478.
- [18] 韩笑, 刘洋洋, 袁君婷, 等. 诱导表达 Cas9 小鼠胚胎干细胞的建立及其应用 [C]//中国遗传学会. 中国的遗传学研究 遗传多样性: 前沿与挑战——2015 中国遗传学会大会论文摘要汇编. 昆明: 中国遗传学会, 2015.

(上接第 10 页)

- [14] 谢德健, 师明磊, 张彦, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 CTCF 蛋白降解细胞系 [J]. 遗传, 2016, 38(7): 651-657.
- [15] 段宇红. CRISPR/Cas9 介导的 PCV2 功能蛋白基因的定点敲入的初步研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- [16] 王晔博. CRISPR/Cas9 靶向编辑技术的优化及其在干细胞中的应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

科技论文写作规范——文内标题

文章内标题力求简短, 一般不超过 20 字, 标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写, 文内标题层次不宜过多, 一般不超过 4 级, 分别以 1; 1. 1; 1. 1. 1; 1. 1. 1. 1 方式表示。